

УДК 579 + 612.017

## ПОКАЗНИКИ ІМУНІТЕТУ ПРИ ВНУТРІШНЬОЧЕРЕВНОМУ ІНФІКУВАННІ МИШЕЙ ЛІНІЇ BALB/C *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Мокрозуб В. В.<sup>1</sup>, Бабенко Л. П.<sup>1</sup>, Воронкова О. С.<sup>2</sup>, Лазаренко Л. М.<sup>1</sup>, Співак М. Я.<sup>1</sup>, Чейпеш А. В.<sup>3</sup>

**Показники імунітету при внутрішньочеревному інфікуванні мишей лінії balb/c *Staphylococcus aureus*. — В. В. Мокрозуб<sup>1</sup>, Л. П. Бабенко<sup>1</sup>, О. С. Воронкова<sup>2</sup>, Л. М. Лазаренко<sup>1</sup>, М. Я. Співак<sup>1</sup>, А. В. Чейпеш<sup>3</sup>. — Результати дослідження фенотипового складу клітин селезінки показали, що при внутрішньочеревному інфікуванні мишей лінії BALB/c стафілококом на початкових етапах розвитку імунної відповіді відбувалась активація клітинної ланки імунітету, що підтверджувалось підвищенням імунорегуляторного індексу CD<sub>4</sub>/CD<sub>8</sub> на 4 добу. На 7 та 13 добу імунорегуляторний індекс CD<sub>4</sub>/CD<sub>8</sub> мав тенденцію до зниження (за рахунок тенденції до підвищення кількості CD<sub>8</sub><sup>+</sup> Т-лімфоцитів) за одночасної тенденції до зниження кількості CD<sub>19</sub><sup>+</sup> В-лімфоцитів. На 13 добу у селезінці підвищувалась кількість ПКК, а у сироватці крові суттєво зростала концентрація інтерферону.**

**Ключові слова:** імунітет, стафілокок, лімфоцити, інтерферон, миші.

**Адреса:** <sup>1</sup> – Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, вул. Академіка Заболотного, 154, Київ МСП, Д 03680, Україна; <sup>2</sup> – Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара, просп. Гагаріна, 72, Дніпропетровськ, 49010, Україна; <sup>3</sup> – Ужгородський національний університет біологічний факультет, м. Ужгород, вул. А. Волошина, 32.

### Вступ

Представники роду *Staphylococcus* здатні викликати широкий діапазон патологічних процесів: від захворювань шкіри, слизових оболонок, дихальної системи, бактеріємії, до хронічних захворювань, які можуть вражати практично будь-який орган, нерідко створюючи при цьому загрозу для життя хворих [7, 10, 14]. Такий широкий діапазон поразок стафілококових інфекцій вимагає пильної уваги і всебічного вивчення, наявності і створення відповідного набору лабораторно-діагностичних методів для підтвердження діагнозу і визначення підходів, а також схем лікування хворих [11, 12, 16]. Мікроорганізми роду *Staphylococcus* є компонентами нормальної мікрофлори людини, що мешкають на шкірі та слизових оболонках різних систем органів, але при загальному ослабленні імунної системи, можуть масово розвиватися і викликати стафілококові інфекції [1, 6].

Від стану імунної системи та її нормального функціонування залежить не лише взаємодія організму із зовнішнім середовищем і необхідна для цього регуляція метаболізму, а й тривалість життя окремих клітин і організму в цілому [2, 18]. Дані, отримані нами раніше [6], показали, що перебіг експериментальної стафілококової інфекції супроводжувався порушенням функціональної активності клітин фагоцитарної системи та природних кілерних клітин, а також пригніченням розвитку реакції гіперчутливості уповільненого типу. Однак не вивчено як впливає стафілококова інфекція на кількість Т- та В-лімфоцитів, а також ПКК, визначення яких, як відомо [9, 10, 15], є одними із головних критеріїв, що застосовуються при діагностиці стану імунної системи. Важливе значення має також дослідження продукції імунорегуляторних цитокінів, зокрема ін-

терферонів, які мають широкий спектр контрольно-регуляторних функцій, направлених на збереження гомеостазу організму [4, 11, 13].

У зв'язку із вищенаведеним, метою нашої роботи було встановлення впливу перебігу стафілококової інфекції на кількість Т- та В-лімфоцитів, ПКК, а також продукцію ендogenous інтерферону на експериментальній моделі мишей лінії BALB/c.

### Матеріали та методи дослідження

Дослідження проведено на білих лабораторних мишах лінії BALB/c віком 18 – 20 тижнів, вагою 18 – 22 г, яких утримували в умовах, що відповідають стандарту [3]. Всі дослідження на тваринах проводилися згідно до норм, встановлених законом України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» та норм, прийнятих в Європейській конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та наукових цілей від 20.09.1985 [8].

Тварин було поділено на групи: група 1 – здорові миші (n = 12); група 2 – тварини, яким внутрішньочеревно вводили суспензію добової культури клітин *Staphylococcus aureus* (n = 15) у дозі 1 x 10<sup>9</sup> клітин на мишу.

Поверхневі антигени Т- та В-лімфоцитів селезінки досліджували за допомогою методу прямої імунофлюоресценції на 2, 4, 7 та 13 добу після інфікування мишей стафілококом. У роботі використовували мишині моноклональні антитіла до CD<sub>3</sub><sup>+</sup>, CD<sub>4</sub><sup>+</sup>, CD<sub>8</sub><sup>+</sup>, CD<sub>19</sub><sup>+</sup>, CD<sub>138</sub><sup>+</sup>, NK антигенів (Myltenyi Biotec, Німеччина). Підрахунок Т- та В-лімфоцитів, а також аналіз результатів проводили на цитофлюориметрі FACStar Plus (Becton-Dickinson, США). Мишині моноклональні антитіла (Myltenyi Biotec, Німеччина) були придбані коштом гранту Президента України.

Активність інтерферону у сироватці крові мишей визначали шляхом мікротитрування у перевивній культурі чутливих клітин (L-929). Активність інтерферону оцінювали за пригніченням цитопатичної дії тест-вірусу (вірусу везикулярного стоматиту, вакцинний штам Н). За титр інтерферону приймали те розведення зразка, при якому спостерігався захист 50 % клітин від цитопатичної дії 100 ТЦД<sub>50</sub>/0,1 мл тест-вірусу [9].

Статистичну обробку отриманих даних проводили за методикою, запропонованою Лакінім [5], використовуючи t-критерій Ст'юдента при рівні значущості 0,05.

### Результати та їх обговорення

За допомогою методу лазерної проточної цитометрії з використанням моноклональних антитіл до CD-антигенів нами досліджено кількість ПКК, Т- та В-лімфоцитів у селезінці мишей, яких внутрішньочеревного інфікували стафілококом (табл. 1). Встановлено

тенденцію до підвищення кількості ПКК в селезінці інфікованих мишей, що спостерігалась на 4 та 7 добу, однак різниця порівняно з контролем виявилась невірною. Однак на 13 добу кількість ПКК підвищувалась суттєво і перевищувала показники контролю. Аналіз даних, наведених у табл. 1, свідчить, що після внутрішньочеревного інфікування мишей стафілококом кількість CD<sub>3</sub><sup>+</sup> Т-лімфоцитів у селезінці не змінювалась. Кількість CD<sub>4</sub><sup>+</sup> Т-лімфоцитів також зберігалась на рівні показників контролю. На 4 та 13 добу встановлено тенденцію до підвищення кількості CD<sub>4</sub><sup>+</sup> Т-лімфоцитів, однак різниця порівняно з контролем була невірною. Зауважимо, що тенденція до підвищення кількості CD<sub>4</sub><sup>+</sup> Т-лімфоцитів може бути пов'язана з накопиченням на початковому етапі розвитку імунної відповіді та етапі її затухання відповідно класичних CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>45</sub>R<sup>+</sup>CD<sub>29</sub><sup>+</sup>Т-хелперів/індукторів та CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>45</sub>R<sup>+</sup>CD<sub>29</sub><sup>-</sup>Тсі-лімфоцитів із супресорною активністю [10, 17].

**Таблиця 1.** Кількість Т- та В-лімфоцитів, а також ПКК у селезінці мишей після інфікування стафілококом

Групи тварин / термін спостереження	Відносна кількість клітин, %						CD <sub>4</sub> /CD <sub>8</sub> , ум. од.	
	CD <sub>3</sub>	CD <sub>4</sub>	CD <sub>8</sub>	ПКК	CD <sub>19</sub>	CD <sub>138</sub>		
Інтактні (контроль)	40,50 ± 2,96	27,60 ± 5,81	19,10 ± 4,33	9,40 ± 0,25	10,90 ± 2,62	3,8 ± 1,3	1,45 ± 0,15	
Інфіковані	2 доба	43,75 ± 3,51	26,60 ± 2,30	21,35 ± 1,85	7,00 ± 0,28	9,75 ± 0,54	7,8 ± 0,85	1,25 ± 0,25
	4 доба	46,65 ± 5,03	31,50 ± 1,80	19,20 ± 1,15	10,15 ± 0,32	11,25 ± 0,95	3,6 ± 0,63	1,64 ± 0,18*
	7 доба	40,00 ± 2,46	29,65 ± 3,67	23,05 ± 2,12	13,15 ± 1,10	8,75 ± 0,77	5,3 ± 0,46	1,29 ± 0,38
	13 доба	42,50 ± 4,42	31,00 ± 4,30	24,30 ± 1,94	16,40 ± 0,71*	8,90 ± 0,18	4 ± 0,67	1,28 ± 0,37

Примітка: \* –  $P < 0,05$  відносно показників контролю

Кількість CD<sub>8</sub><sup>+</sup> Т-лімфоцитів у селезінці інфікованих мишей не змінювалась відносно показників контролю. На 13 добу виявлено тенденцію до підвищення кількості цих клітин, однак різниця порівняно з показниками контролю була невірною. Встановлено, що внаслідок перерозподілу CD<sub>4</sub><sup>+</sup> та CD<sub>8</sub><sup>+</sup> Т-лімфоцитів на 4 добу після інфікування мишей стафілококом підвищувався імунорегуляторний індекс CD<sub>4</sub>/CD<sub>8</sub> (за рахунок тенденції до підвищення кількості CD<sub>4</sub><sup>+</sup> Т-лімфоцитів). Отримані дані дають підставу припустити, що розвиток імунної відповіді на внутрішньочеревне інфікування мишей стафілококом на початкових етапах пов'язаний з активацією клітинної ланки імунітету. На 7 та 13 добу імунорегуляторний індекс CD<sub>4</sub>/CD<sub>8</sub>, навпаки, незначно зменшувався (за рахунок тенденції до підвищення кількості CD<sub>8</sub><sup>+</sup> Т-лімфоцитів), однак різниця порівняно з контролем виявилась невірною.

На рівні показників контролю зберігалась також кількість CD<sub>19</sub><sup>+</sup> В-лімфоцитів та плазматичних CD<sub>138</sub><sup>+</sup> клітин. Встановлено тенденцію до зниження кількості CD<sub>19</sub><sup>+</sup> В-лімфоцитів на 7 та 13 добу, та тенденцію до підвищення кількості плазматичних CD<sub>138</sub><sup>+</sup> клітин на 2 та 7 добу після інфікування мишей стафілококом, однак ці показники вірогідно не відрізнялись від норми.

Результати дослідження інтерферогенної активності організму інфікованих стафілококом мишей наведено на рис. 1. На 2, 4 та 7 добу концентрація сироваткового інтерферону зберігалась на рівні показників контролю і дорівнювала відповідно  $5,25 \pm 1,01$ ;  $6,80 \pm 0,98$  та  $5,28 \pm 0,88 \log_2$  Од/мл проти  $5,86 \pm 1,01 \log_2$

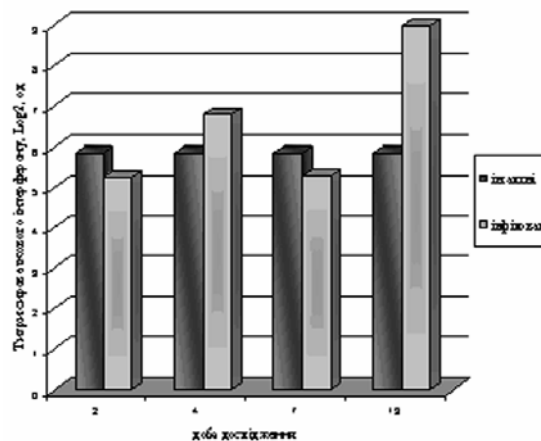


Рис. 1. Концентрація інтерферону у сироватці крові мишей лінії BALB/c, інфікованих стафілококом

Од/мл ( $P > 0,05$ ), але підвищувалась на 13 добу до  $9,00 \pm 0,67 \log_2$  Од/мл ( $P < 0,05$ ).

Отже, результати дослідження фенотипового складу клітин селезінки, показали, що при внутрішньочеревному інфікуванні мишей стафілококом на початкових етапах розвитку імунної відповіді відбувалась активація клітинної ланки імунітету, що підтверджувалось підвищенням імунорегуляторного індексу CD<sub>4</sub>/CD<sub>8</sub> (за рахунок тенденції до підвищення кількості CD<sub>4</sub><sup>+</sup> Т-лімфоцитів) на 4 добу. Зауважимо, що на 4 добу встановлено також тенденцію до підвищення вмісту інтерферону у сироватці кро-

ві. На 7 та 13 добу імунорегуляторний індекс  $CD_4/CD_8$  мав тенденцію до зниження (за рахунок тенденції до підвищення кількості  $CD_8^+$  Т-лімфоцитів) за одночасної тенденції до зниження кількості  $CD_{19}^+$  В-лімфоцитів. Зауважимо, що ефективний захист організму від стафілококу забезпечується розвитком як клітинного, так і гуморального імунітету. Звертає на себе увагу те, що на 13 добу у селезінці підвищу-

валась кількість ПКК, а у сироватці крові суттєво зростала концентрація інтерферону. Отримані нами дані показали, що внутрішньочеревне інфікування мишей стафілококом є адекватною експериментальною моделлю для вивчення впливу перебігу внутрішньочеревної стафілококової інфекції на показники імунореактивності організму.

1. *Вихоть Н. Е., Спивак Н. Я., Черная Л. Н.* Влияние стафилококка и его антигенных субстанций на интерферогенез и корректирующее действие интерферона при стафилококковой инфекции / в кн. Стафилококк /биологически активные субстанции, иммунный ответ на антигены/, "Наукова думка", Киев, 1988. С. 138–147.
2. *Гайдаш І.С., Флегонтова В.В., Суглобов Є.В., Салманова О.М., Потьомкін Є.І.* Апоптозіндукуюча активність пептидогліканів та тейхоевих кислот грампозитивних збудників гнійно-запальних захворювань у хірургічних хворих // Вестник гигиены и эпидемиологии – 2001. – №1. – с. 70 – 72.
3. *Лабораторные животные: разведение, содержание, использование в эксперименте* /под ред. И.П. Западнюка и соавт. – К: Вища школа, 1983. – 383с.
4. *Лазаренко Л. Н.* Модуляция интерферонами функциональной активности фагоцитирующих клеток при стафилококковой инфекции/ автореф. дис. на соискание ученой степени канд. биол. наук. Киев, 1991, 17 с
5. *Лакин Г. Ф.* Биометрия. – М: Высшая школа, 1980. – 293с.
6. *Мокрозуб В. В., Бабенко Л. П., Воронкова О. С., Полішко Т. М., Вінніков А.І.* Активність фагоцитарної ланки імунітету при дисбіотичних станах урогенітальної системи, спричинених *Staphylococcus aureus* та можливість їх корекції препаратами пробіотиків //Медицинні перспективи. – 2009. – Т. 14. – №3. – С. 69 – 73.
7. *Олешко Г.М., Любченко Г.А.* Біохімічні складові та імунобіологічна активність факторів патогенності стафілококів // Український біохімічний журнал. – 2006. – Т.78. – №1. – С. 20–28.
8. *Резніков О.* Проблеми етики при проведенні експериментальних медичних і біологічних досліджень на тваринах // Вісник НАНУ. – 2001. – № 1. – С. 5 – 7.
9. *Современные методы диагностики вирусных респираторных инфекций и их терапии с использованием препаратов интерферона (Методические рекомендации)* / Под ред. Модзелевского А.Ф., Дяченко Н.С., Спивака Н.Я. – Киев, 1994. – 18 с.
10. *Соколова І. Є., Вінніков А. І., Полішко Т. М.* Основи імунології. – Дніпропетровськ: Видавництво Дніпропетровського національного університету, 2007. – 560 с.
11. *Спивак Н. Я.* Антибактериальная эффективность препаратов интерферона и его индукторов в различных биологических системах: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук: Институт микробиологии и вирусологии. – Киев, 1987. – 48 с.
12. *Спивак Н. Я., Лазаренко Л. Н., Михайленко О. Н.* Интерферон и система мононуклеарных фагоцитов. – Киев: Фитосоциоцентр, 2002. – 164 с.
13. *Хазиев А. Ф., Михайлова Н. А.* Молекулярные механизмы цитотоксического действия  $\alpha$ -токсина *Staphylococcus aureus*. // Журнал микробиологи эпидемиологи и иммунобиологии. – 2007. – №1. – С. 77 – 83.
14. *Хазиев А. Ф., Михайлова Н. А., Блинкова Л. П.* Взаимодействие  $\alpha$ -токсина *Staphylococcus aureus* с клетками эукариотов и их мишенями // Журнал микробиологи эпидемиологи и иммунобиологии. – 2006. – №2. – С. 110 – 114.
15. *Чистович Г. Н.,* Эпидемиология и профилактика стафилококковых инфекций, М.:Мед, 1969, 138 с.
16. *Швембергер И. Н., Гинкул Л.Б.* Апоптоз: роль в нормальном онтогенезе и патологии // Вопросы онкологии. – 2002. – № 2. – с. 153 – 157.
17. *Якобсик М.* Імунологія. – Вінниця: Нова книга. – 2004. – 672 с.
18. *Behnia M., Robertson N. I., Martin W. J.* Role of Apoptosis in Host Defense and pathogenesis of disease // Chest. – 2000. – № 117. – P. 1771 – 1777.

Отримано: 14 грудня 2009 р.

Прийнято до друку: 4 лютого 2010 р.